沙棘果油对过氧化氢诱导的氧化损伤的保护作用

郑鹏[1]，王波[2*]，王前[1]
（1. 西北濒危药材资源开发国家工程实验室/陕西师范大学生命科学学院，西安 710119；2. 西安文理学院 生物与环境工程学院/西安市秦岭天然产物开发与抗癌类创新药物研究重点实验室，西安 710065）

摘要： 沙棘油有植物抗氧化、抗炎症及抗肿瘤多种药理作用。为了探讨沙棘果油对 H_2O_2 造成氧化性损伤的细胞生长的影响及其抗氧化性，该研究选择了 H_2O_2 对 RAW264.7 细胞氧化损伤模型，首先通过 DPPH（1,1-二苯基-2-三硝基苯肼)自由基清除实验检测沙棘果油体外抗氧化能力;再用(3-(4，5-二甲基噻唑-2)-2，5-二苯基四氮唑溴盐)MTT 法和流式细胞仪检测超氧化物阴离子荧光探针（DHE）信号，分别检测不同浓度沙棘果油对 H_2O_2 损伤细胞的存活率和超氧化物阴离子水平。结果表明:(1)与维生素 C 的抗氧化能力相比，沙棘果油在 DPPH 自由基清除实验中当沙棘果油浓度在小于 4.9%时，沙棘果油的抗氧化能力大于维生素 C；(2)MTT 法发现，浓度 3.125%的沙棘果油对 H_2O_2 损伤的细胞存活率显著升高（$P<0.01$）；(3)DHE 检测发现，同一时间点，随着沙棘果油浓度增加，DHE 阳性细胞比例显著下降（$P<0.01$），在不同检测时间随着沙棘果油浓度增加，DHE 阳性细胞比例显著升高（$P<0.01$）。沙棘果油对过氧化氢诱导的 RAW264.7 细胞氧化损伤模型有一定修复作用，可能与细胞内超氧化物阴离子水平受到抑制有关，它具有抗氧化性损伤的潜能。

关键词：沙棘果油，抗氧化性，MTT 法，DHE，过氧化氢损伤模型

中图分类号：Q943.2　　　　**文献标识码**：A

Protective effect of sea buckthorn pulp oil on oxidative damage induced by hydrogen peroxide

ZHENG Peng[1], WANG Bo[2*], WANG Qian[1]
(1. *National Engineering Laboratory for Resource Development of Endangered Crude Drugs in Northwest China/College of Life Sciences, Shaanxi Normal University*, Xi'an 710119, China; 2. *College of Bioogical and Environmental Engineering/Key Laboratory of Natural Product Development and Anticancer Innovative Drug Research in Qinling, Xi'an University*, Xi'an 710065, China)

Abstract: The seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) oil is medically claimed as having phytoantioxidant, antiinflammatory, and anticancerous properties in humans. To explore the

---

收稿日期：2020-08-27
基金项目：国家重点研发计划(2017YFC1701300)；中央高校基本科研业务费科技成果转化培育项目(GK201806005)；陕西省科技厅项目(2020JQ-888, 2019ZDLSF04-01-01, 2019SF-307)；西安市科技计划项目（CXY1531WL17）[Supported by the National Key R & D Program of China(2017YFC1701300); Central University Basic Research Service Fee Project(GK201806005); Key Special Project of Shaanxi Provincial Science and Technology Department(2020JQ-888, 2019ZDLSF04-01-01, 2019SF-307); Xi'an Science and Technology Plan Project(CXY1531WL17)]。
作者简介：郑鹏(1981-)，男，河南济源人，博士，实验师，研究方向为药用资源开发及植物生物技术，（E-mail)zhengpeng@snnu.edu.cn。
*__通信作者__：王波，博士，副教授，研究方向为药用资源利用及动物生理学研究，（E-mail）wangb_2013@163.com。

hydrogen peroxide of the seabuckthorn pulp oil on mouse monocyte macrophages (RAW264.7 cells) oxidative damage model. By spectrophotometry, scavenging effects of seabuckthorn pulp oil on DPPH free radicals; *In vitro* antioxidant activity was assessed on RAW264.7 cells against hydrogen peroxide (H_2O_2) induced cytotoxicity. The antioxidant effect was determined by measuring the cell dye MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) reducing assay. Then the survival rate of RAW264.7 cells was determined by MTT assay, and the expression of superoxide anion was determined by flow cytometry labeling with dihydroethidium(DHE). The results were as follows: (1)Compared with the antioxidant capacity of vitamin C, when the concentration of seabuckthorn pulp oil was less than 4.9%, the antioxidant capacity of seabuckthorn pulp oil was higher than vitamin C; (2) Comparing the H_2O_2 group, 3.125% seabuckthorn pulp oil group had higher survival rate(P<0.01); (3) Comparing the H_2O_2 group, the proportion of DHE-positive cell was significantly decreased in the same time (P<0.01) and it was negative effect with concentration of seabuckthorn pulp oil; the proportion of DHE-positive cell was significantly increased at the same concentration(P<0.01), and which was related positive effect with concentration of seabuckthorn pulp oil（P<0.01）. These results support the protective effects of seabuckthorn pulp oil against hydrogen peroxide-induced toxicity *in vitro* with the underlying mechanisms of inhibiting oxidative stress. Taken together, these results clearly indicate that seabuckthorn pulp oil has significant potential as a natural antioxidant agent, which could be a potential source for the discovery of natrual antioxidant health product.

Keywords: seabuckthorn pulp oil, oxidation resistance, MTT, DHE, hydrogen peroxide damage model

人体在代谢过程中会产生活性氧自由基（ROS），包括超氧阴离子(O^{2-}) 、羟自由基(·OH) 、过氧化氢(H_2O_2) 和脂质过氧化物的中间产物（Chauhan et al.,1997）。在正常的生理情况下，线粒体需要消耗约 2% 的氧产生的 ROS，由呼吸链底物端释放出电子还原氧分子单电子，产生 ROS 的前体--O^{2-}和 H_2O_2。很多疾病及衰老时，体内氧自由基会产生异常积累。过量的 ROS 会导致细胞损伤或细胞凋亡。ROS 的活泼性和氧化反应能力都很强，能通过氧化作用攻击细胞的生物大分子物质(核酸、蛋白质、糖类、脂质) 。当人体处于亚健康状态时，自由基异常累积会引发疾病。近年来，天然抗氧化剂因其安全、高效，且能够满足亚健康人群日常保健需求的特点受到广泛关注。

沙棘（*Hippophae rhamnoides*）是一个具有药用价值的植物，它是多年生落叶灌木或小乔木，适应性强，能显著改善生态环境（丁健等，2016）。其中的沙棘果油是从沙棘的果肉中提取的油液，是沙棘的精华，食用安全性高（林黎等，2018）。目前沙棘对调节血脂（边庆荣等，1999）、促进微循环（吴英等，2000）、抗炎、调节免疫（车锡平等，2000）以及抗癌（李忌等，2008）等方面研究的已有报道。我们前期研究发现，沙棘果油对酒精引起小鼠骨髓细胞微核率和肝脏损伤有一定改善作用（王波，2019）。研究发现沙棘果油中含有棕榈油酸、棕榈酸、油酸、亚油酸和不饱和脂肪酸，都是人体不能自身合成的脂肪酸，还含有维生素 C、E 和胡萝卜素等多种生物活性物质（刘凤云，2005）。目前发现黄酮类化合物、多酚类化合物、维生素类、多肽类、多糖类物质等均可作为天然抗氧化剂使用（魏安琪，2018）。已有研究发现沙棘果油在体外具有抗氧化性（赵二劳等，2017），但仅仅利用 DPPH 自由基清除实验和 Fenton 实验在体外检测了沙棘果油的抗氧化活性，而其在体内的抗氧化效果仍不清楚。目前对日常可摄入的食品中的天然抗氧化成分含量研究较少，尤其是低浓度下的抗氧化能力研究更为缺乏，沙棘果油作为常用的保健品，在细胞水平有必要对其抗氧化能力进行深入研究。然而 ROS 具有性质活泼和反应性强的特点，既易还原又易氧化，其本身并

不稳定。其检测手段有以下几种：电子自旋共振法(ESR) 、高效液相色谱法、气相色谱法、化学发光法、荧光分析法、分光光度法以及电化学方法。但是，这些检测手段能够直接测定的方法相当有限，所以迫切需要开发直接测定 ROS 或其他自由基的检测方法（吕惠萍等，2015）。

因此，本研究拟通过 H_2O_2 氧化刺激 RAW264.7 细胞建立氧化损伤的细胞模型，并给予沙棘果油进行干预，通过细胞存活率等指标的检测；再通过荧光探针（DHE）检测细胞内超氧化物阴离子水平，检测 DHE 阳性细胞比例，间接反映体内 ROS 水平，从多角度探讨沙棘果油对氧化损伤的治疗，以期为人们正确认识沙棘果油的保健功能特性、以及沙棘果油产品的研发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品与试剂

RAW264.7 细胞（小鼠单核巨噬细胞）(由中国科学院上海分院细胞库提供)。细胞培养试剂和消耗材料购于 Gibco 公司；胰蛋白酶、过氧化氢、3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐（MTT）购于国药集团化学试剂有限公司；沙棘果油购于山西五台山沙棘制品有限公司；培养基购于 Hyclone 公司；96 孔板购于 Corning 公司；超氧化物阴离子荧光探针（dihydroethidium, DHE）购于碧云天生物技术研究所。其他试剂均为国产分析纯。

1.1.2 设备

二氧化碳孵育箱（HERE cell150）（Thermo 公司）；酶标仪 (AD340)，（Beckmann 公司）；流式细胞仪（accurl C6）（BD 公司）。

1.2 方法

1.2.1 DPPH 自由基清除实验

以维生素 C 这个天然的抗氧化剂作为阳性对照，采用 DPPH 法评估沙棘果油体外的抗氧化活性，并为沙棘果油体内抗氧化能力的检测提供浓度依据。

取沙棘果油 6%（无水乙醇溶解）；设置阳性对照：维生素 C（标准溶液，6%，超纯水溶解）无水乙醇稀释 100 倍：6%对半稀释。沙棘果油与维生素 C 各设置 6 个浓度梯度 6%、3%、1.5%、0.75%、0.375%、0.1875%。取 96 孔板，每个浓度梯度设置 8 个复孔，每孔首先加入 100 μL 样品溶液后加入 DPPH（0.24%乙醇溶液）。设置空白对照（100 μL 样品溶液+100 μL 无水乙醇），阴性对照（100 μL 无水乙醇+100 μL DPPH 工作液）。避光常温放置 20 min，通过紫外-可见分光光度法测定在 517 nm 吸光度， 取平均值。根据公式计算每个浓度的 DPPH 清除率，做折线图。

清除率（%）= $[(1-(A_{样品}-A_{空白})/A_{对照})]\times 100\ \%$。

1.2.2 RAW264.7细胞培养

将RAW264.7细胞置于含有10%FBS及1%P/S的1640培养基，在温度为37 ℃、5% CO_2的培养箱中进行孵育，取对数生长期细胞用培养基调整细胞浓度为1×10^4个待用。

MTT溶液的配制：生理盐水溶解1 g的MTT固体，定容，配制成5 $mg\cdot mL^{-1}$，在无菌环境下过0.22 μm滤膜除菌分装，尽量避光，存放于-4 ℃的冰箱下备用。

1.2.3 H_2O_2氧化损伤模型建立

将培养基重悬细胞接种细胞于 96 孔板中（每板细胞数量约 1×10^6 个）。每孔加 200 μL 培养基，摇匀，过夜培养。第二天，吸出每孔废液，通过 1.2 的 DPPH 实验可以发现，沙棘果油在浓度 5%以下均有较好的抗氧化性。所以分别加入浓度为 5.000%、2.500%、1.250%、0.625%、0.313%、0.156%的 H_2O_2 培养基。每组有一个空白对照。24 h 后加入每孔 200 μL 的 MTT(5 $mg\cdot mL^{-1}$)培养基。放置 4 h（37 ℃，5% CO_2）后每孔加入 150 μL DMSO。摇床摇

10 min（37 ℃）后用酶标仪在 490 nm 处检测吸光度，得出适于实验的 H_2O_2 浓度后使用不会明显影响细胞生长的沙棘果油浓度进行 MTT 实验。

1.2.4 沙棘果油对H_2O_2氧化损伤的作用

通过 1.3 找出最适 H_2O_2 浓度溶解后，将沙棘果油按照 6.250%、3.125%、1.563%、0.781%、0.390%的浓度梯度加入 H_2O_2 培养基作为实验组，以合适浓度的 H_2O_2 损伤为阴对照组；以每孔 200 μL 培养基为空白组。每孔 200 μL 培养基，摇匀，过夜培养。吸出每孔废液，加入每孔 200 μL 的 MTT(5 $mg{\cdot}mL^{-1}$)培养基。每组 6 个复孔，放置 4 h（37 ℃，5% CO_2）后吸出废液，每孔加入 150 μL DMSO。摇床摇 10 min（37 ℃）后用酶标仪在 490 nm 处检测吸光度。实验重复 3 次。细胞存活率=(实验组 OD 值－空白对照组 OD 值)/(阴性对照组 OD 值－空白对照组 OD 值)×100%。

1.2.5 基于超氧阴离子荧光探针（DHE）的细胞检测

调整细胞密度到每孔含有 1×10^5~1×10^6 的细胞密度，每孔加 2 mL 培养基，过夜培养。分别加入含有适于浓度的双氧水培养基溶解沙棘果油（浓度 6.25%、3.125%、1.563%、0.781%、0.390%、0.195%，用 DMSO 助溶）每孔 2 mL。分别放置 2、6、12 和 24 h 后吸去废液，加入 2 mL 含有 DHE 荧光探针（终浓度 10 $mmol{\cdot}L^{-1}$）的培养基 30 min 后，吸去废液，用 PBS 清洗，使用每孔 200 μL 胰蛋白酶消化（37 ℃，5% CO_2 ），然后用培养基终止消化，1 500 $r{\cdot}min^{-1}$ 离心 10 min 弃去上清，用冷 PBS 重悬重复两遍，然后使用流式细胞仪 FL2 通道检测。

1.2.6 统计学方法

所有实验数据均采用均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示，采用 SPSS 20. 0 软件进行数据处理，沙棘果油对 H_2O_2 氧化损伤细胞的存活率采用比较单因素方差分析；DHE 检测的数据采用双因素方差分析（时间×浓度）， 如果有差异进一步通过 Post-hoc Bonferroni’s 进行分析。

2 结果与分析

2.1 DPPH自由基清除实验

由图 1 可得沙棘果油浓度在 1.6%到 3%时，其清除自由基的能力则比 1.6%之前的清除自由基能力稍减弱，当沙棘果油浓度超过 3%时，其清除自由基的能力不再改变。随着维生素 C 浓度的上升，其抗氧化能力一直上升，当维生素 C 浓度 0.2%到 3%时，维生素 C 浓度与清除率成正比，当浓度超过 3%时，它的抗氧化能力会稍减弱。综合结果可以得出，沙棘果油与维生素 C 同样具有抗氧化性，当两者浓度位于 4.8%之前时，沙棘果油对自由基的清除能力比维生素 C 要强。但由于，在沙棘果油浓度超过 3%时，其清除自由基的能力不再改变，而维生素 C 清除自由基的能力随其浓度的改变依旧在增加，可见在超过 3%时，维生素 C 对自由基依然有一直增加的清除能力，比沙棘果油的清除能力强。说明低浓度的沙棘果油在体外与公认的抗氧化剂维生素 C 的抗氧化能力差不多。

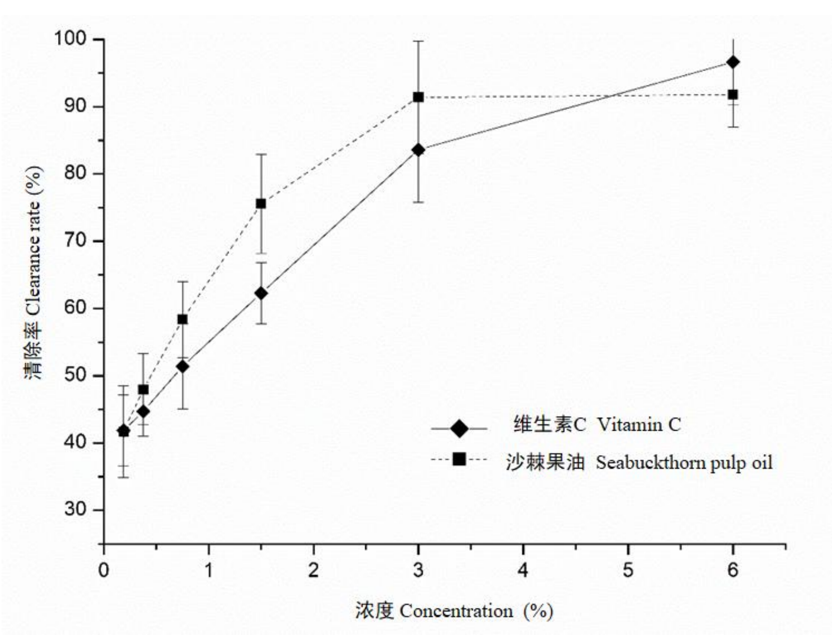


图 1 DPPH 自由基清除实验

Fig.1 DPPH free radical scavenging experiment

2.2 H_2O_2氧化损伤模型的确定

通过酶标仪读取并计算出不同浓度 H_2O_2 的平均 OD 值，通过改良寇式法：$lgIC_{50}$=Xm-I(P-(3-Pm-Pn)/4)计算，式中：Xm 为 lg 最大剂量；I 为 lg(最大剂量/相临剂量)；P 为阳性反应率之和；Pm 为最大阳性反应率；Pn 为最小阳性反应率，得到它的 IC_{50}，计算出 H_2O_2 的 IC_{50} 为 0.859%，结果如表 1 所示，根据实验我们选用 0.625%的 H_2O_2 构建氧化损伤模型。

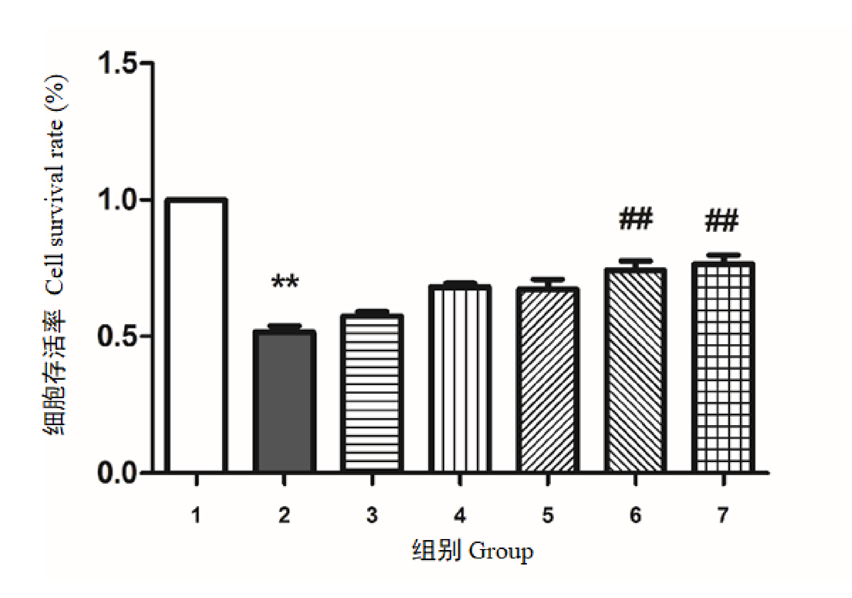
表 1 不同浓度过氧化氢氧化损伤 RAW264.7 细胞的 OD 平均值

Table 1 Average OD of RAW264.7 cells damaged by H_2O_2 oxidation at different concentrations

过氧化氢浓度 H_2O_2 concentration	OD 平均值 OD average
空白组 Blank group	0.060 0
0.156%	0.262 2
0.313%	0.232 4
0.625%	0.2274
1.25%	0.143 4
2.5%	0.075 8
5.00%	0.085 4

2.3 沙棘果油对H_2O_2氧化损伤的作用

结果如图 2 所示，与对照组相比，H_2O_2 氧化损伤造成细胞存活率显著下降（P<0.01）。沙棘果油浓度从 0.195%到 3.125%之间，而 H_2O_2 处理后的细胞存活率随着沙棘果油的浓度提高而提高。与 H_2O_2 处理组相比，加入 3.125%和 6.25%沙棘果油处理组的系存活率显著提高（P<0.01）。而 3.125%和 6.25%沙棘果油组之间的存活率无显著差异。由此可见，我们在体外实验中选取的沙棘果油的浓度在体内抗 H_2O_2 氧化损伤实验中也是适用的，且对 H_2O_2 氧化损伤引起的细胞存活有一定的保护作用。



1. 对照组；**2**. 双氧水组；**3**. 0.390%沙棘果油加双氧水组；**4**. 0.781%沙棘果油加双氧水组；**5**. 1.563%沙棘果油加双氧水组；**6**. 3.125%沙棘果油加双氧水组；**7**. 6.250%沙棘果油加双氧水组。**表示 $P < 0.01$ ，第 2 组 vs 第 1 组；## 表示 $P < 0.01$，第 2 组 vs 第 6，7 组。

1. Control group; **2**. H_2O_2 group; **3**. H_2O_2 add 0.390% seabuckthorn pulp oil group; **4**. H_2O_2 add 0.781% seabuckthorn pulp oil group; **5**. H_2O_2 add 1.563% seabuckthorn pulp oil group; **6**. H_2O_2 add 3.125% seabuckthorn pulp oil group; **7**. H_2O_2 add 6.250% seabuckthorn pulp oil group. ** means P<0.01, 2 vs 1; ## means P<0.01, 2 vs 6,7.

图 2 沙棘果油对 RAW264.7 细胞氧化损伤的细胞存活率作用（n=6）

Fig.2 Effects of seabuckthorn pulp oil on cell survival rate of RAW264.7 cell oxidative damage （n=6）

2.4 流式细胞检测DHE

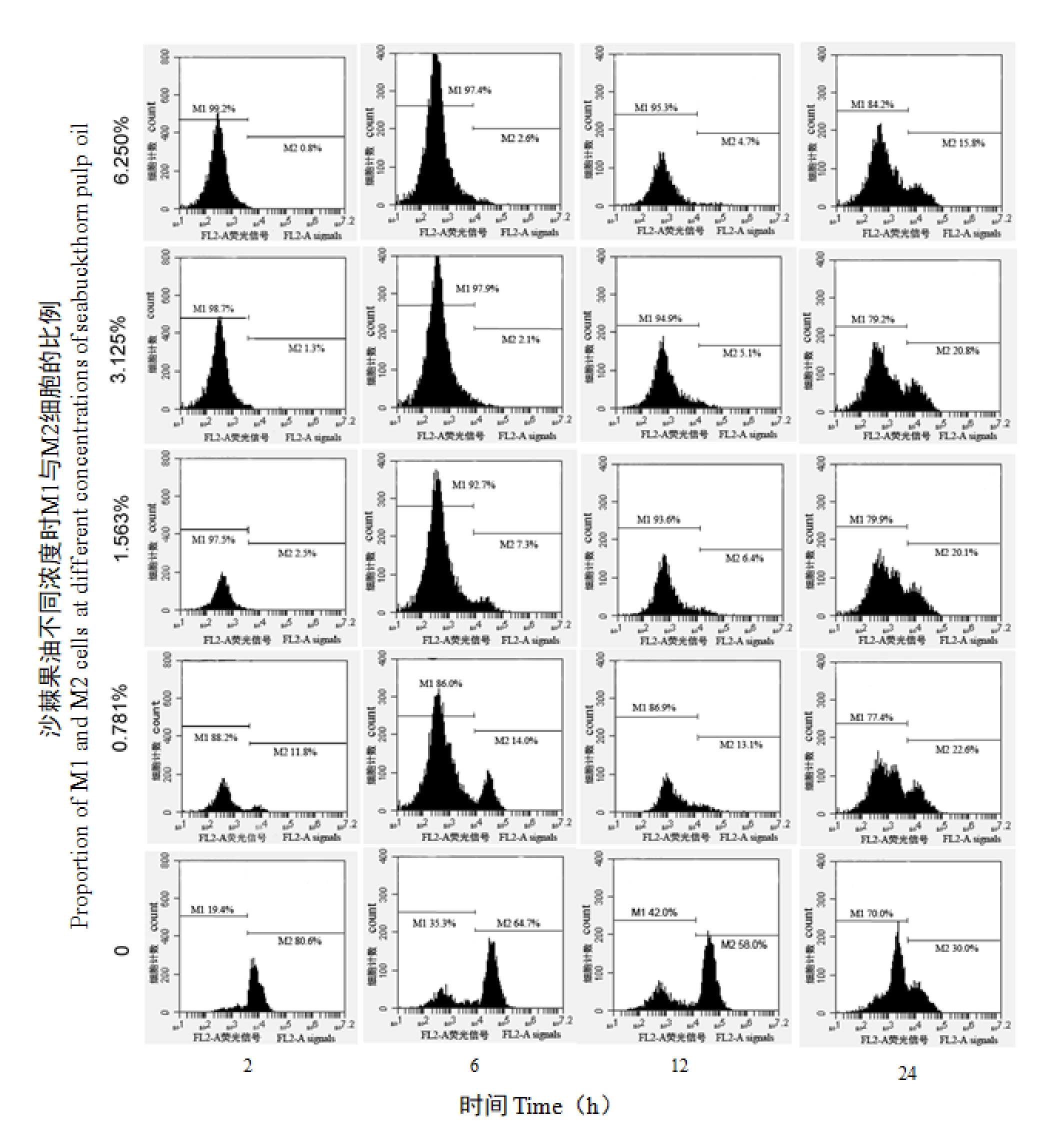
通过 DHE 进一步检测 DHE 阳性细胞所占比例，我们发现不同浓度的沙棘果油之间的 DHE 阳性细胞所占比例（F =15.763, P<0.01），不同时间的 DHE 阳性细胞所占比例也具有显著性差异（F =7.439, P<0.01），而时间与浓度之间没交互作用（F =2.16, P>0.05）。结果显示，0.781%组在各个时间点 DHE 阳性细胞所占比例没有差异（P>0.05）。6.250%沙棘果油组在 2 h 时 DHE 阳性细胞（M2）减少了 99%；6 h 时 M2 细胞减少了 96%；12 h 时 M2 细胞减少了 91%；而当达到 24 h 时 M2 细胞减少只达到 47%。可见，随着时间的延长，沙棘果油对胞内超氧阴离子产生的抑制作用显著下降（P<0.01）。3.125%沙棘果油组在 2 h 时 M2 细胞减少了 97%； 6 h 时 M2 细胞减少了 96%；12 h 时 M2 细胞减少了 91%；24 h 时 M2 细胞减少了 30%。由此可见，当沙棘果油浓度达到 3.125%与 6.250%对胞内超氧阴离子产生的抑制作用无显著区别（P>0.05）（表 2 和图 3）。可见不同浓度沙棘果油随着氧化损伤时间的延长，对超氧化物阴离子造成的损伤保护能力有所下降；在同一时间氧化损伤时间内，随着沙棘果油浓度增加抵抗超氧化物阴离子损伤的细胞有所减少。在一定浓度范围内，所以沙棘果油的抗氧化能力与浓度呈正相关；与损伤时间呈负相关。

表 2 不同浓度沙棘果油的 DHE 阳性细胞比例

Table 2 Proportion of DHE positive cells with different concentrations of seabuckthorn pulp oil

组别 Group	M2 细胞含量百分比（%）Percentage of M2 cell content (%)			
	2 h	6 h	12 h	24 h

H_2O_2 组 H_2O_2 group	30.0±3.45	58±5.63	64.7±5.91	80.6±6.14
0.781% 沙棘果油+ H_2O_2 组 0.781% seabuckthorn pulp oil + H_2O_2 group	11.8±2.43	14±4.35	13.1±2.25	22.6±5.36
1.563%沙棘果油+ H_2O_2 组 1.563% seabuckthorn pulp oil + H_2O_2 group	2.5±0.56	7.3±3.21	6.4±2.11	20.1±3.19
3.125%沙棘果油+ H_2O_2 组 3.125% seabuckthorn pulp oil+ H_2O_2 group	1.3±0.23	2.1±0.55	5.1±1.63	20.8±3.64
6.250%沙棘果油+ H_2O_2 组 6.250% seabuckthorn pulp oil + H_2O_2 group	0.8±0.14	2.6±78	4.7±1.31	15.8±4.61



横坐标代表不同时间流失细胞仪检测结果，纵坐标代表不同浓度的沙棘果油组。M1 表示正常细胞，M2 是 DHE 阳性细胞。

The abscissa represents the results of cytometer detection at different times, and the ordinate represents the

seabuckthorn pulp oil group with different concentrations. M1 means normal cells, M2 is DHE positive cells.

图 3 沙棘果油作用后对 H_2O_2 造成的损伤细胞不同时间 M1/M2 细胞比例

Fig.3 Proportions of M1 to M2 cells to H_2O_2 damaged cells caused by seabuckthorn pulp oil at different time

3 讨论

本实验首次利用 H_2O_2 氧化损伤细胞模型检测天然低剂量的沙棘果油的抗氧化性。通过体外 DPPH 法发现，沙棘果油的浓度在 5%以下具有较好的抗氧化；可见沙棘果油在使用时浓度并非越高越好。通过 MTT 法我们发现，沙棘果油在一定浓度范围提高了受氧化损伤细胞的存活率。在细胞水平进一步验证了沙棘果油具有较好的抗氧化性（曹韦等，2016）。在日常摄入量较少情况下也能够发挥抗氧化功效，有利于进一步阐明常见天然抗氧化剂在人体内的活性机制与药用价值，对于预防自由基诱发的疾病，保护人体健康具有积极意义。

H_2O_2 是一种重要的活性氧，大量存在会造成细胞的氧化应激反应，导致细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)的增多（范东艳等，2018）。超氧阴离子自由基($O_2^{\bullet-}$)是细胞内氧气发生单电子还原反应产生的活性氧自由基(ROS)产物（张雯等，2017）。沙棘果油提高了 H_2O_2 氧化损伤细胞存活率的实验结果提示，沙棘果油可能降低了胞内过量 $O_2^{\bullet-}$ 的产生。研究发现当机体产生过量 $O_2^{\bullet-}$ 后，可以激活细胞的自噬或凋亡信号通路，导致细胞死亡，最终引发多种疾病（Dickinson et al., 2011）。DHE 是最常用的检测细胞内超氧化物阴离子水平的荧光探针。通过流式细胞仪灵敏地监测 $O_2^{\bullet-}$ 阳性细胞的比例，结果进一步验证了沙棘果油减少了 $O_2^{\bullet-}$ 阳性细胞的数量，这可能是沙棘果油对氧化损伤细胞保护的作用途径之一。实验发现，沙棘果油在使用 6 h 内效果较好，但是随着时间的延长， $O_2^{\bullet-}$ 阳性细胞的比例所有增加，可见沙棘果油对氧化损伤对细胞的保护能力减弱，提示，沙棘果油可能需要少量多次使用才能达到较好的效果。这为日常沙棘果油的使用量及使用次数提供了一定理论指导（张雯等，2017）。除了 $O_2^{\bullet-}$ 以外，沙棘果油是否还参与其他通路抑制氧化应激过程还需要进一步研究。沙棘果油的成分较为复杂，尽管我们知道沙棘果油中含有维生素类，但沙棘果油降低超氧阴离子自由基的功效具体是哪个成分仍需进一步验证。本研究为沙棘果油在细胞水平的抗氧化研究提供了一定的参考，为进一步开发沙棘果油的给予了理论依据。

参考文献：

BIAN RQ, JIANG DS, MA XT, et al.， 1999. Study on the effect of sea buckthorn oil on blood lipid regulation in rats[J]. Carcinoge,Teratoge & Mutage, 11(6): 330. [边庆荣，蒋东升，马晓彤，等，1999. 沙棘油对大鼠血脂调节作用的研究[J]．癌变、畸变、突变，11(6)：330.]

CAO W, CHEN XP, LIU N, et al.， 2016. The protective effect of gastrodin on primary cortical neurons in rats injured by hydrogen peroxide[J]. Asia-Pacific Trad Med, 12(24): 17-20. [曹韦，陈小鹏，刘娜，等，2016. 天麻素对过氧化氢损伤大鼠原代皮层神经元保护作用研究[J]. 亚太传统医药，12(24)：17-20.]

CHAUHAN D, PANDEY P, OGATA A, et al., 1997. Cytochrome c-dependent andindependent induction of apoptosis in multiple myeloma cells[J]. J Biol Chem, 272(48):29995-29997.

CHE XP, XU W, HUO HR, et al.，2000. Experimental study on anti-inflammatory effect of seabuckthorn fruit oil and its influence on immune function[J]. Seabuckthorn Hippophae, 13(4): 28-32. [车锡平，徐威，霍海如，等，2000. 沙棘果油的抗炎作用和对免疫功能影响的实验研究[J]．沙棘，13(4)：28-32.]

DICKINSON BC, CHANG CJ, 2011. Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses[J]. Nat Chem Biol, 7(8):504-511. doi: 10.1038/nchembio.607.

DING J, GUAN Y, RUAN CJ, et al., 2016. Optimization by orthogonal array design of sea buckthorn fruit oil extraction and determination of fatty acid composition[J]. Food Sci, 37(2): 13-18. [丁健，关莹，阮成江，等，2016. 沙棘果油提取工艺的正交试验优化及其脂肪酸组分测定[J]. 食品科学，37(2)：13-18.]

FAN DY, BAMA DJ, PAN YY, et al.，2018. Study on the induction of keratinocytes apoptosis by inhibiting oxidative stress in crude suga extract from alpine shrub[J]. Tibetan Med, 39(3): 19-21. [范东艳，白玛多吉，潘永越，等，2018. 高山灌木苏嘎纯提取液抑制 H_2O_2 诱导的角朊细胞凋亡的研究[J]. 西藏医药，39(3)：19-21.]

LI J, WANG XX, ZHENG RL, 2008. Effects of sea buckthorn extract on cancer cell DNA, protein synthesis and cAMP content in plasma *in vivo*[J]. Seabuckthorn Hippophae, 21(1): 8-10. [李忌, 王肖萱, 郑荣梁,2008. 沙棘提取物对癌细胞 DNA 、蛋白质合成及体内血浆中的 cAMP 含量的影响[J].沙棘，21(1)：8-10.]

LIN L, LIU KL, TIAN YQ, et al.，2018. Toxicological safety assessment of sea buckthorn oil[J]. J Prevent Med Inform, 34(6): 792-797. [林黎，刘科亮，田玉琼, 等，2018. 沙棘果油的安全性毒理学评价[J].预防医学情报杂志，34(6)：792-797.]

LIU FY, 2005. Pharmacological research of sea buckthorn[J]. Bull Biol, 40(2): 13-15. [刘凤云，2005. 沙棘油的药理研究[J]. 生物学通报，40(2)：13-15.]

LÜ HP, ZHU Q, 2015. General situation of research on oxidative damage and genetic toxicity detection[J]. J Anhui Agric Sci, 43(14): 7-9. [吕惠萍，朱琪，2015. 氧化损伤与遗传毒性的检测研究概况[J].安徽农业科学，43(14)：7-9.]

WANG B, 2019. Effect of sea buckthorn fruit oil on alcohol-induced micronucleus rate and liver damage in mouse bone marrow cells[J]. Shaanxi J Agric Sci, 65(5): 39-41. [王波，2019. 沙棘果油对酒精引起小鼠骨髓细胞微核率和肝脏损伤的影响[J]. 陕西农业科学，65(5)：39-41.]

WEI AQ, 2018. Study on inhibition mechanism of natural antioxidants on nitrogen/oxygen free radical damage[D]. Beijing: Beijing University of Technology: 3. [魏安琪，2018. 天然抗氧化剂对氮/氧自由基损伤抑制机制的研究[D]. 北京：北京工业大学：3.]

WU Y, WANG BW, LIU QJ, et al.，2000. Effect of sea buckthorn oil on microcirculation[J]. Pharmacol Clin Chin Mat Med, 16(6): 18-19. [吴英，王秉文，刘秋娟，等，2000. 沙棘油对微循环的影响[J]. 中药药理与临床，16(6)：18-19.]

ZHANG W, ZHANG J, LI P, et al.，2017. Recent advances in fluorescent probes for imaging of superoxide anion radical[J]. Chin J Anal Chem, 45(12): 1838-1844. [张雯，张娇，李平，等，2017.荧光/化学发光探针成像检测超氧阴离子自由基的研究进展[J].分析化学，45(12)：1838-1844.]

ZHAO EL, XU F, YIN AP, et al.，2017. Fatty acid compositions and antioxidant activities of sea buckthorn pulp oil and sea buckthorn seed oil[J]. Chin Oils Fats, 42 (2): 120-123. [赵二劳，徐芬，尹爱萍，等，2017. 沙棘果油与沙棘籽油脂肪酸组成及其抗氧化活性[J]. 中国油脂，42(2)：120-123.]